



REDES MOLECULARES REVELAM METABOLOMAS BACTERIANOS ENDOFÍTICOS DISTINTOS EM VARIANTES SELVAGENS E SOMACLONAIAS DE *Cereus peruvianus* MILL. (CACTACEAE) PARA DESCOBERTA DE PRODUTOS NATURAIS

Jesieli Beraldo-Borrazzo¹, Anderson Valdiney Gomes Ramos², Francieli Alana Pereira Valeze³, Julio Cesar Polonio⁴, Claudete Aparecida Mangolim⁵, Maria De Fatima Pires Da Silva Machado⁶

¹ Pesquisadora pós-doc.

² Co-orientador, Doutor

³ Professora, Doutora

⁴ Orientadora, Doutora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá-PR. jesieliberaldo@gmail.com. jcpolonio2@uem.br. mangolimca@gmail.com. mfpismachado@uem.br

⁵ Pesquisador

⁶ Mestre do Curso de pós-graduação em Química-UEM. Departamento de Química. Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá-PR. anderson_ramos.19@hotmail.com. alanafranhp@gmail.com

RESUMO

A compreensão da vasta diversidade química microbiana impulsionou a descoberta de produtos naturais ainda inexplorados, tornando a metabolômica uma abordagem fundamental para estudos de alto rendimento focados em produtos naturais microbianos. Neste estudo, o objetivo foi avaliar o metaboloma de bactérias endofíticas isoladas do cacto *Cereus peruvianus*, cultivadas a partir de sementes (CS) e somaclones regenerados *in vitro* (CR), utilizando a geração de redes moleculares. Os espectros de massa obtidos por UHPLC-HRMS/MS foram processados com o software Data Analysis™ (Bruker) e analisados na plataforma GNPS (*Global Natural Products Social*), gerando redes moleculares (*Molecular Networking*). Para o grupo CR, 78 metabólitos foram anotados pelo GNPS, enquanto para o grupo CS, 136 estruturas químicas foram anotadas. Dos metabólitos anotados pelo GNPS, 44 foram confirmados com base em similaridades espectrais, perfis de fragmentação e busca bibliográfica. Dentre os compostos anotados, destacaram-se as classes químicas de flavonoides, surfactinas, macrolídeos, terpenos e vitaminas, compondo os metabolomas endofíticos associados a plantas de *C. peruvianus* com diferentes origens genéticas. Observou-se que o perfil químico do metaboloma endofítico isolado da planta regenerada apresenta maior diversidade de metabólitos anotados em comparação ao metaboloma endofítico isolado da planta selvagem, sendo diversas classes de compostos exclusivas do metaboloma endofítico de acordo com a planta hospedeira. A combinação de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e à análise de rede molecular (RM) proporcionou uma caracterização detalhada dos metabolomas de bactérias endofíticas associadas a *C. peruvianus*, permitindo uma exploração abrangente do potencial químico desses organismos em diferentes contextos genéticos.

PALAVRAS-CHAVE: Cactáceas; Endófitos; Flavonoides; Macrolactinas; Metabolômica.

1 INTRODUÇÃO

A relação de endofitismo é capaz de resultar na produção de compostos metabólicos singulares e até mesmo exclusivos. O fenômeno de interação planta-microrganismos é onipresente e diverso na natureza e devido ao seu envolvimento em diversas associações hetero específicas, cada planta é considerada como uma unidade complexa única que resulta no desenvolvimento de um metabolismo sintrófico (Aghdam; Brown, 2021). As pressões de seleção coevolutivas impõem uma associação cooperativa/balanceada entre endófitos e plantas hospedeiras, evoluindo para gerar estruturas químicas que interajam com determinados alvos biológicos, seja por sinais químicos para comunicação, nutrição, defesa de nicho ou para inibir o crescimento de competidores (antagonismo) (Chevrette et al., 2020). Além disso, para aqueles endófitos considerados sistêmicos, há indícios de troca regular de material genético entre ambos, proporcionando ao endófito a capacidade de



produzir compostos metabólicos semelhantes ao da planta hospedeira (Raime; Adeleke, 2021).

Desta maneira, a biossíntese de metabólitos especializados por endófitos, que são aqueles microrganismos que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar sintomas de patogenicidade e compartilham repertório metabólico semelhante ou mesmo complementar ao da planta hospedeira, resulta em misturas químicas altamente complexas reguladas e produzidas a partir da expressão de *clusters* gênicos biossintéticos (BGCs) dependentes de genótipo especificidade e de modulação biosintética específica a estressores abióticos (Bind et al., 2022). Essas características, associadas a grupos específicos de vegetais e biomas, fazem dos endofíticos organismos muito interessantes para a exploração e produção de compostos naturais bioativos de interesse, assim como para a compreensão de padrões metabólicos e fisiológicos das plantas hospedeiras.

Cactáceas da espécie *C. peruvianus* são consideradas importantes plantas medicinais e nutracêuticas da América do Sul (Nunes et al., 2022; Santos et al. 2021), por serem utilizadas para o tratamento de diversas doenças como distúrbios pulmonares, reumatismo e no tratamento tópico de feridas e litíase, além de serem utilizadas na medicina popular para perda de peso, redução dos níveis de colesterol (LDL), como diurético e cardiotônico. Substâncias pertencentes a diferentes classes de compostos químicos como ácidos graxos, polissacarídeos, terpenos, alcaloides e ácidos fenólicos são relacionadas as estas propriedades fitoquímicas e farmacológicas de *C. peruvianus* (Santos et al., 2021).

Plantas regeneradas *in vitro* de *C. peruvianus* para a obtenção de mudas em larga escala e produção de compostos químicos de interesse, geraram variantes somaclonais que apresentam variabilidade genética distinta das plantas cultivadas na natureza a partir de sementes (Mangolin et al., 1997). Quando tecidos de calos foram usados para o restabelecimento de plantas de *C. peruvianus in vitro*, as plantas regeneradas apresentaram variabilidade genética, bem como perfis químicos diferenciados (Mangolin et al., 1997; Mangolin et al., 2002). A complexidade química observada nos organismos vegetais é reflexo do estabelecimento e da composição do seu microbioma endofítico. Como observado por Beraldo-Borrazzo et al. (2021), diferentes comunidades de bactérias endofíticas foram isoladas e identificadas para plantas de *C. peruvianus* desenvolvida naturalmente a partir de sementes em comparação a planta de *C. peruvianus* regenerada *in vitro*.

Desta forma, o estudo de metabolomas envolvidos nas interações de endofitismo podem trazer importantes contribuições acerca da interação planta-microrganismos, dependentes da biossíntese de compostos especializados. A metabolômica é uma ciência emergente e tem promovido grande impacto em uma variedade de áreas científicas, com destaque para a química de produtos naturais, por possibilitar o estudo das metabolomas. A caracterização química de matrizes biológicas complexas alcançou avanços marcantes por meio do uso de redes moleculares como estratégia de desreplicação (Qin et al., 2022). Isto porque, a geração de redes moleculares permite a visualização global da diversidade química presente em uma amostra, possibilitando a organização de grandes conjuntos amostrais, o que representa rapidez e versatilidade quando comparada a técnicas de desreplicação clássicas.

Portanto, o objetivo no presente estudo foi realizar análises metabolômicas de extratos bacterianos endofíticos por meio de estudo de desreplicação por UHPLC-HRMS/MS e *Molecular Networking* para comparação dos perfis metabólicos de bactérias endofíticas isoladas de *C. peruvianus* cultivado a partir de sementes e de somaclone regenerado *in vitro*.



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Linhagens de bactérias endofíticas isoladas de plantas de *C. peruvianus* desenvolvido a partir de sementes e de plantas somaclones regeneradas *in vitro*, respectivamente denominadas de CS e CR, conforme descrito por Beraldo-Borrazzo et al. (2021), foram mantidas em armazenamento sob refrigeração entre 4-6 °C e preservadas em solução de glicerol 30% à -80 °C, além de serem mantidas em condições axênicas de cultivo. Cada grupo (CR e CS) é constituído por 15 linhagens endofíticas e são pertencentes à Coleção de Microrganismos Endofíticos e do Ambiente do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (CMEA-LBIOMIC), localizado na Universidade Estadual de Maringá (UEM). O acesso ao patrimônio genético brasileiro foi registrado no SISGEN (*National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge*) sob código AC8F7D2.

2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS METABÓLICOS

A obtenção dos extratos metabólicos foi realizada conforme Polli et al. (2021) com modificações. Inicialmente as bactérias endofíticas foram cultivadas em microtubos com meio TSB durante 48 h e diluídas em solução salina 0,85% para atingirem a concentração de 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro, com o auxílio da escala de McFarland 0.5. Posteriormente, 500 µL da suspensão resultante foi alíquotada em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio TSB, sendo incubados sob agitação (120 rpm/ 28 °C) durante 3 dias. Após este período, o meio fermentado foi centrifugado em tubos cônicos de 50 mL com 2.750 x g por 15 minutos. Este procedimento também foi realizado com meio de cultura na ausência do inóculo, como controle de esterilidade e também como controle de moléculas presentes no meio.

Para a extração dos metabólitos produzidos, o sobrenadante do meio fermentado (aproximadamente 15 mL) foram transferidos para um funil de separação e submetido à partição líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila (EtOAc- grau P.A). A partição com acetato de etila foi repetida três vezes (3 x 10 mL) para 15 mL do meio fermentado, resultando em um volume final de 30 mL de EtOAc. A fração orgânica do acetato de etila com os metabólitos foi filtrada com algodão e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo (banho frio: ±4 °C/ banho quente: 37 °C/ pressão: 600 mmHg), obtendo-se o extrato bruto de metabólitos.

2.3 ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO POR UHPLC-HRMS/MS

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 (75 × 2.0 mm i.d.; 1.6 µm) (Shimpack XR- ODS III) mantida à temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu em H₂O Milli-Q (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B). O programa de gradiente de eluição foi: 5% de acetonitrila (0-1 min), 30% de acetonitrila (1-3 min), 95% de acetonitrila (3-8 min) e por fim mantida a 95% de acetonitrila (8-16 min), com uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min e volume de injeção foi de 2 µL. Acoplado ao cromatógrafo, foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução com analisador quadrupolo-Tempo de voo (QTOF), modelo IMPACT II (Bruker Daltonics Corporation, EUA) e equipado com uma fonte de ionização Electrospray. No espectrômetro de massas, a voltagem capilar foi operada no modo de ionização positiva, regulada a 4500 V, utilizando formiato de sódio (10 µM) como calibrante. Os parâmetros do gás seco foram ajustados para 8 L/min a 200°C



com uma pressão de gás de nebulização de 4 bar. A fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) ocorreu usando gás de colisão de argônio (Ar) e energia de colisão de 5-50 eV. Os dados espectrais das amostras investigadas foram recolhidos a partir de m/z 50-1000, e com uma taxa de aquisição de 5 espectros por segundo. Os íons de interesse foram selecionados por auto-fragmentação de varredura MS/MS.

2.4 ANOTAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BASEADA EM MOLECULAR NETWORKING

Para a anotação de substâncias e organização dos dados brutos obtidos das análises por UHPLC-MS/MS utilizou-se a abordagem de *Molecular Networking*. Inicialmente os dados brutos foram convertidos para o formato *mzXML*, através do *software* de dados *Data Analysis™* (Bruker) e carregados para a plataforma do GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) (Wang et al., 2016). No GNPS, os dados foram submetidos para formação das redes moleculares utilizando o fluxo de trabalho online. Os dados foram agrupados com MS-Cluster com uma tolerância de massa parental de 0,02 Da e uma tolerância do íon fragmento MS/MS de 0,02 dá para criar espectros de consenso. Uma rede então foi criada onde os parâmetros das bordas foram pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 4 picos correspondentes.

Os dados foram filtrados removendo todos os picos de MS/MS dentro de ± 17 Da do precursor m/z . Em seguida, a rede foi pesquisada em relação às bibliotecas espectrais do GNPS e todas as correspondências apresentaram a pontuação de cosseno acima de 0,7 e pelo menos 4 picos correspondentes. A análise de rede foi exportada do GNPS e analisada no *Cytoscape* (Shannon et al., 2003) e os dados obtidos também foram comparados com dados da literatura. A análise do branco também foi incluída e os nós correspondentes aos íons detectados no branco foram excluídos das redes moleculares.

2.5 CLASSIFICAÇÃO DAS CLASSES QUÍMICAS DOS PRODUTOS NATURAIS ENDOFÍTICOS POR MEIO DE MOLNETENHANCER

Para aprimorar as informações estruturais químicas dentro da rede molecular, informações de anotações de estrutura *in silico* do GNPS Library Search, do *Network Annotation Propagation* (NAP) e do *Dereplicator* foram incorporadas à rede usando o fluxo de trabalho GNPS *MolNetEnhancer* (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/molnetenhancer/>). O arquivo de lista de picos LC-MS/MS pré-processado também foi submetido ao *MS2LDA* ([//MS2LDA.org](http://MS2LDA.org)). As anotações de classes químicas foram realizadas usando a ontologia química por meio do *ClassyFire* (Wang et al., 2016).

A abordagem de triagem de metabólitos produzidos por bactérias endofíticas isoladas de plantas de *C. peruvianus* desenvolvido naturalmente no ambiente a partir de sementes, em relação aos metabólitos produzidos a partir da comunidade microbiana endofítica isolada de *C. peruvianus* regenerado *in vitro*, foi realizada avaliando putativamente a similaridade espectral das amostras através da geração de redes moleculares de similaridade espectral. A anotação estrutural dos metabólitos foi confirmada por meio da análise de candidatos e seus análogos sugeridos usando ferramentas de mineração de dados e organização da plataforma GNPS pelos bancos de dados de produtos naturais, bibliotecas de espectros de massa de referência e dados precisos de massa (m/z), padrão de fragmentação MS/MS e tempo de retenção cromatográfica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

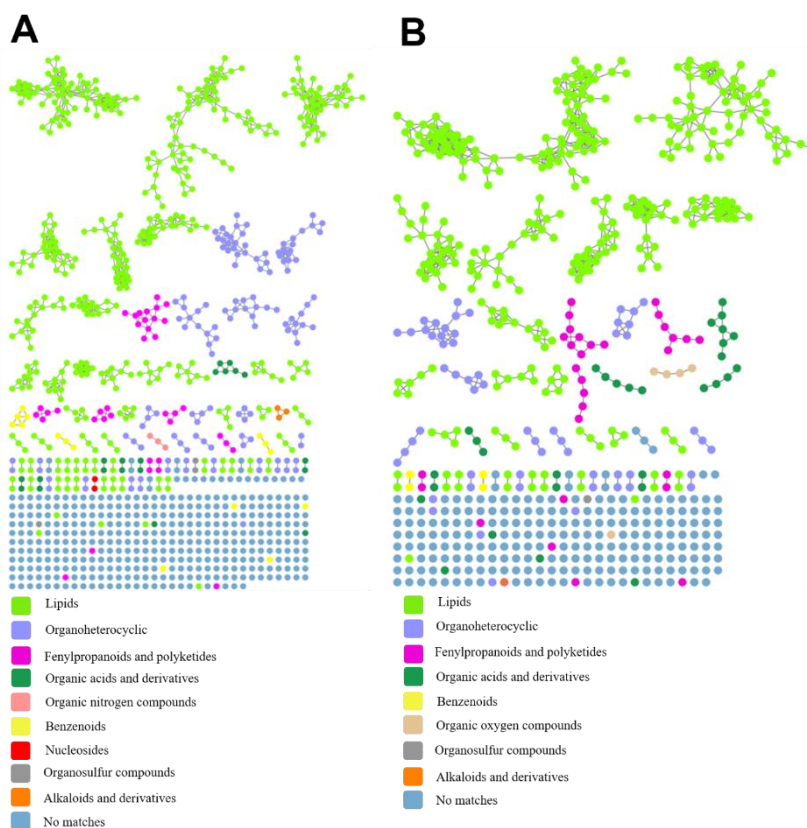
A interpretação manual de espectros de massa é impraticável quando se trata de análise baseada em experimentos metabolômicos não direcionados, dada a grande



quantidade de dados espectrais gerados. A Rede Molecular Social de Produtos Naturais Globais (GNPS) é uma plataforma de desreplacação de alto rendimento, devido a desreplacação ser mediada por um algoritmo de alinhamento espectral que permite a detecção de correspondências significativas para análogos putativos de compostos conhecidos ou compostos pertencentes à mesma classe geral de moléculas por meio de correspondência espectral (Van Der Hooft et al., 2020; Wang et al., 2016).

A análise de *MolNetEnhancer* associada às ferramentas *in silico* NAP (MetFrag) e *Dereplicator*, incluindo o método de descoberta subestrutural (MS2LDA), forneceu a classificação química putativa das famílias moleculares geradas, a nível de superclasses, para as linhagens bacterianas endofíticas dos grupos CR (isoladas de *C. peruvianus* regenerado *in vitro*) e CS (isoladas de *C. peruvianus* cultivado por meio de sementes). O *MolNetEnhancer* para o grupo CR classificou os metabólitos da rede molecular em nível de superclasse principalmente em: lipídios ou derivados, compostos organoheterocíclicos, fenilpropanóides e policetídeos, benzenoides, ácidos orgânicos e derivados, compostos orgânicos nitrogenados, compostos orgânicos sulfurados, alcalóides e derivados e nucleosídeos (Figura 1 A). Enquanto a classificação química dos metabólitos do grupo CS, consistiu em oito classes químicas principais: lipídeos ou derivados, compostos organoheterocíclicos, fenilpropanóides, ácidos orgânicos, compostos orgânicos oxigenados, compostos orgânicos sulfurados, benzenoides e alcalóides e derivados (Figura 1 B).

Figura 1: Redes moleculares para anotação de classes químicas usando *MolNetEnhancer* de metabolomas endofíticos isolados de *C. peruvianus* regenerado (CR) e de *C. peruvianus* desenvolvido naturalmente por meio de sementes (CS). **(A):** Rede molecular grupo CR. **(B):** Rede molecular grupo CS. Os nodos em azul são referentes a compostos não classificados para anotação.



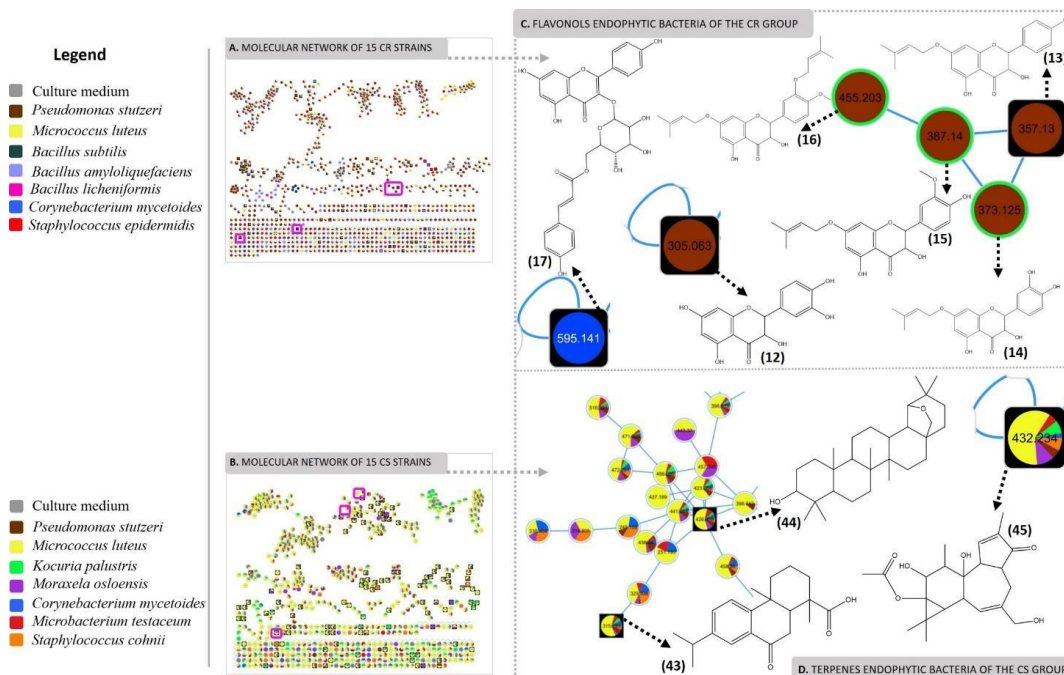
Fonte: Autor.



A fim de avaliar e comparar o perfil metabolômico produzido por comunidades microbianas endofíticas isoladas de plantas de *C. peruvianus*, RM de metabólitos foram geradas separadamente para as linhagens bacterianas endofíticas dos grupos CR (Figura 2A) e CS (Figura 2B). Para obter resultados com maior similaridade estrutural e origem biossintética dentro de famílias moleculares a partir de redes moleculares, os íons parentais dentro das redes moleculares corresponderam a apenas quatro padrões conhecidos dentro da biblioteca espectral do GNPS, com limite para a similaridade do valor de cosseno estabelecido em 0,7. A desreplicação dos dados espectrais pelo GNPS resultou em 1113 nodos para a RM CR, enquanto para RM CS foram gerados 750 sinais espectrais. Isso demonstra que o grupo CR, referente ao *C. peruvianus* regenerado, apresentou uma maior diversidade química de substâncias anotadas.

A análise de compostos anotados sugeridos pela biblioteca espectral do GNPS após inspeção do perfil dos padrões de fragmentação MS/MS, avaliação do erro de massa exata e comparação com dados disponíveis na literatura, resultou na identificação putativa de 44 metabólitos baseados em anotações de níveis II e III (Schymanski et al., 2014). Classes de compostos como vitaminas (Piridoxina, $C_8H_{11}NO_3$) (44), dicetopiperazinas ($C_{20}H_{19}N_3O_2$ e $C_{16}H_{17}N_3O_2$) (4), (5), derivados de clorofila ($C_{35}H_{36}N_4O_5$ e $C_{55}H_{74}N_4O_5$) (1), (2) e indóis como ácido 3-indolacético ($C_{10}H_9NO_2$) (20) foram observados como biomoléculas comuns aos dois grupos avaliados (CS e CR).

Figura 2: Redes moleculares contendo as principais famílias moleculares identificadas na análise de desreplicação de metabolomas endofíticos de *C. peruvianus* usando a plataforma GNPS. **A.:** Rede molecular de metabólitos endofíticos isolados de somaclones de *C. peruvianus* regenerado *in vitro*. **B.:** Rede molecular de metabólitos endofíticos isolados de *C. peruvianus* desenvolvido a partir de sementes. **C.:** Flavonoides anotados para a rede molecular CR. **D.:** Terpenoides anotados para a rede molecular CS. Os retângulos em rosa nas RM correspondem às substâncias identificadas em destaque para a RM CR e CS. Nodos com bordas pretas indicam substância anotada pelo GNPS. Nodos com bordas verdes indicam substâncias identificadas com base em similaridades espectrais, perfil de fragmentação e literatura.



Fonte: Autor.

Para a espécie mais representativa da RM CR, *Pseudomonas stutzeri*, foram identificadas anotações para flavonoides. Didroquercetina, m/z 305,0661 (12), foi anotado



pela desreplicação do GNPS, assim como derivados de diidroquercetina, também produzidos por *P. stutzeri* (Figura 2C). Estes derivados foram agrupados em uma família molecular (FM) com anotação para O-prenylaromadendrin (m/z 357,1333) (13). A verificação do padrão de fragmentação composta pelos outros três nodos presentes no cluster, possibilitou realizar a identificação putativa de outros derivados de flavonoides contendo o grupo O-prenil na estrutura, denominados como O-prenyltaxifolin (m/z 373,1282) (14), O-prenyl-methoxyflavonol derivative (m/z 387,1438) (15) e O-prenylflavonol derivative (m/z 455,2064) (16).

Dentre as diversas funções dos flavonoides na planta há a de mediadores de interações planta-microrganismos. Os flavonoides exercem papéis importantes nesta dinâmica estabelecida entre plantas hospedeiras e microrganismos, desde ação sobre patógenos, promoção de crescimento, como até, na detecção de *quorum* bacteriano (Wang et al., 2022). Moléculas flavonoides podem ser biotransformadas em moléculas de sinalização de autoindutores (AIs) (Wang et al., 2022), que são moléculas que estão envolvidas no mecanismo de comunicação celular, *quorum sensing*, utilizado por bactérias para desencadear mudanças na expressão gênica para o desempenho de funções cruciais para a sua sobrevivência e o seu sucesso ecológico (Abisado et al., 2018).

Funções como excreção de toxinas, antimicrobianos para competição com outras espécies ou cooperação com parceiros simbióticos, enzimas extracelulares, exopolissacarídeos para formação de biofilme e mecanismo de enxameamento para motilidade e fixação de nitrogênio para nodulação em raízes, são alguns exemplos deste mecanismo adaptativo em ambientes naturais desencadeado pelos flavonoides (Zeng et al., 2023). De acordo com Yu et al. (2020), os flavonoides apigenina e fletetina foram capazes de aumentar a motilidade de enxameação, como também a produção de fibras de celulose e curli em *Pseudomonas fluorescens*, sendo estes mecanismos fundamentais para a colonização bem-sucedida da superfície das raízes das plantas.

Micrococcus luteus, uma actinobacteria, representou 60% dos isolados de *C. peruvianus* cultivados a partir de sementes (Beraldo-Borrazzo et al., 2021). *M. luteus* levou a formação de uma família contendo anotados para terpenoides, produzidos por todas as linhagens de *M. luteus* do grupo CS. O terpeno anotado 1,4a-dimethyl-9-oxo-7-propan-2-yl-3,4,10,10a-tetrahydro-2H-phenanthrene-1-carboxylic acid, de m/z 315,1960 (41), ocupou a mesma FM junto ao 19,28-Epoxyoleanan-3-ol de m/z 425,3783 (42). Notou-se que um derivado de terpeno também pode ser putativamente identificado em outro cluster da rede molecular CS como *single node*, com m/z de 432,2386 (43) (Figura 2D). Nos últimos anos vários terpenoides de alto valor foram identificados a partir da produção por endófitos (Chen et al., 2021). Terpenos como diglucosídeo de zeaxantina e ginsenosídeo são produzidos por espécies bacterianas endofíticas de *Pseudomonas* sp. e *Agrobacterium* sp., respectivamente (Fidan; Zhan, 2019; Yan et al., 2019). E, mais recentemente, Subramanian e Marudhamuthu, (2020) identificaram a produção do terpeno taxol a partir de hospedeiro não *Taxus*, em bactérias endofíticas como *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis* e *Oceanobacillus picturae* de macroalgas marinhas.

Neste estudo dois grandes grupos de moléculas, as macrolactinas e os lipopetídeos, não apresentaram correspondências anotadas pelo GNPS. Assim, a identificação putativa dessas substâncias foi realizada com base nas diferenças de massa observadas nas redes moleculares, além da comparação dos espectros MS/MS obtidos com os padrões de fragmentação descritos na literatura para essas classes químicas de compostos (Li et al., 2021).

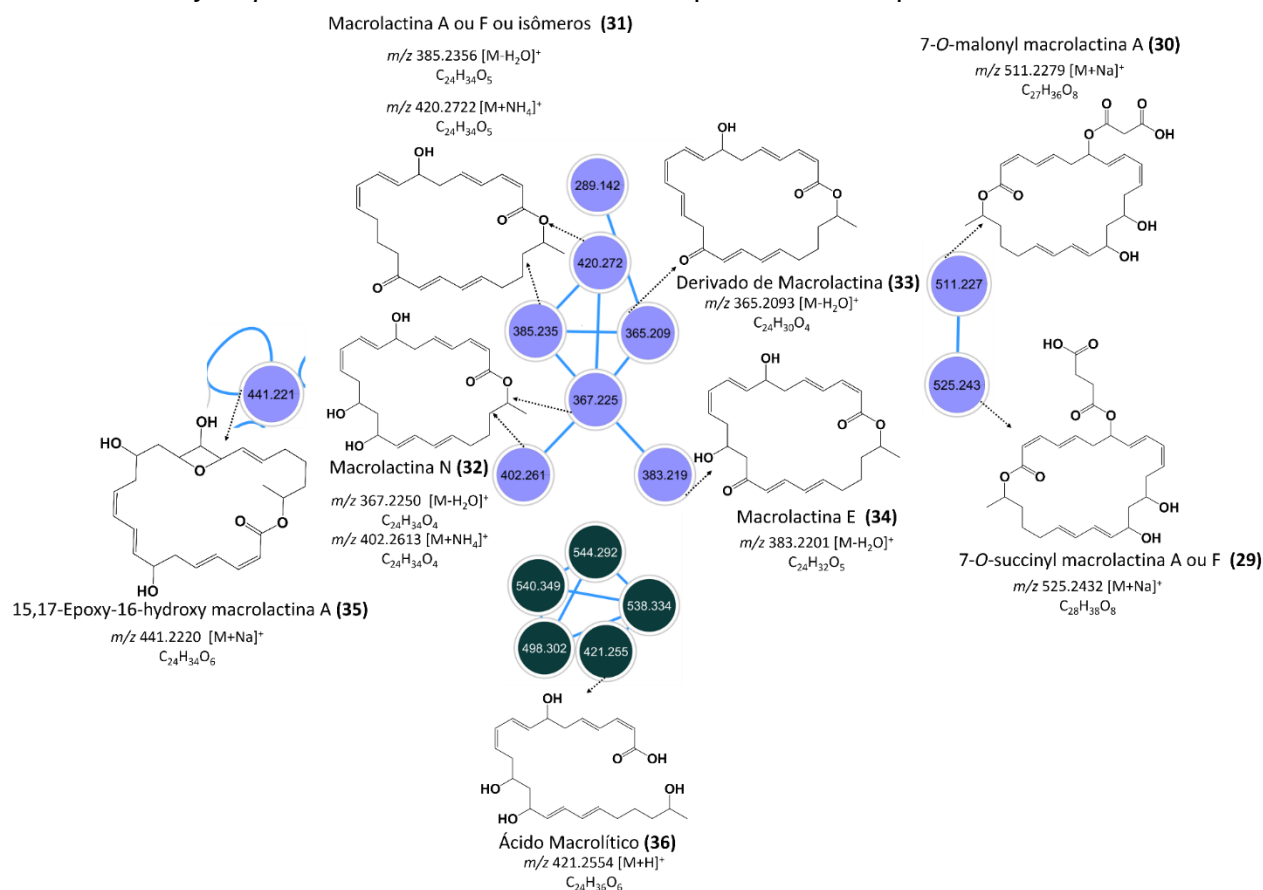
As macrolactinas são um grande grupo de macrolídeos composto por anel de lactonas de 22 a 25 membros, classificadas de acordo com elementos estruturais dienos, além da posição e o número de ligações olefínicas no anel de lactona e cadeia lateral



variada, contendo grupos funcionais ácidos carboxílicos e hidroxilas. Os compostos macrolídeos são reconhecidos como um grande grupo de ação antibiótica (Xu et al., 2024).

Um dos gêneros bacterianos mais representativos para produção de macrolactinas são os *Bacillus* spp. Neste estudo, foram observadas famílias moleculares (FM) únicas de macrolactinas, incluindo m/z 525,2464 (7-O-succinyl macrolactin A ou F) (29), m/z 511,2308 (7-O-malonyl macrolactin A) (30) (Figura 3). O par de nodos em m/z 525,2464 e m/z 511,2308, foram obtidos na forma de adutos de sódio $[M+Na]^+$. Os respectivos espectros de massa obtidos apresentaram íons fragmentos principais em m/z 407, que corresponderam a perda de $C_4H_6O_4$ (118 Da) e $C_3H_4O_3$ (104 Da) referentes aos grupos succinyl e malonyl, respectivamente. O íon fragmento observado em m/z 363 foi atribuído a perda de um resíduo de CO_2 (44 Da) das estruturas (Li et al., 2021). Outras macrolactinas agrupadas em uma família molecular foram observadas na forma de diferentes adutos $[M+H-H_2O]^+$, $[M+Na]^+$ e/ou $[M+NH_4]^+$, m/z 385,2373; m/z 420,2750 (Macrolactin A ou isômeros) (31), m/z 367,2268; m/z 402,2644 (Macrolactin N) (32), m/z 383,2217 (Macrolactin E) (34), m/z 441,2253 (15,17-epoxy-16-hydroxy macrolactin A) (35) (Figura 3).

Figura 3: Grupo de macrolactinas obtidas pela desreplicação do GNPS para espécies de *Bacillus* spp. isoladas de *C. peruvianus* regenerado. Identificadas putativamente por similaridades espectrais, perfil de fragmentação e literatura. Nodos na cor roxa representam a espécie *B. amyloliquefaciens*. Nodos na cor verde representam a espécie *B. subtilis*.



Fonte: Autor.

Com base na literatura não encontramos correspondência estrutural para a m/z 365,2111. Sua estrutura foi proposta por similaridade estrutural das outras estruturas de macrolactinas identificadas para a mesma FM, por isso podemos sugerir se tratar de um novo derivado da classe de macrolactinas (33) (Figura 3). Os derivados de macrolactinas

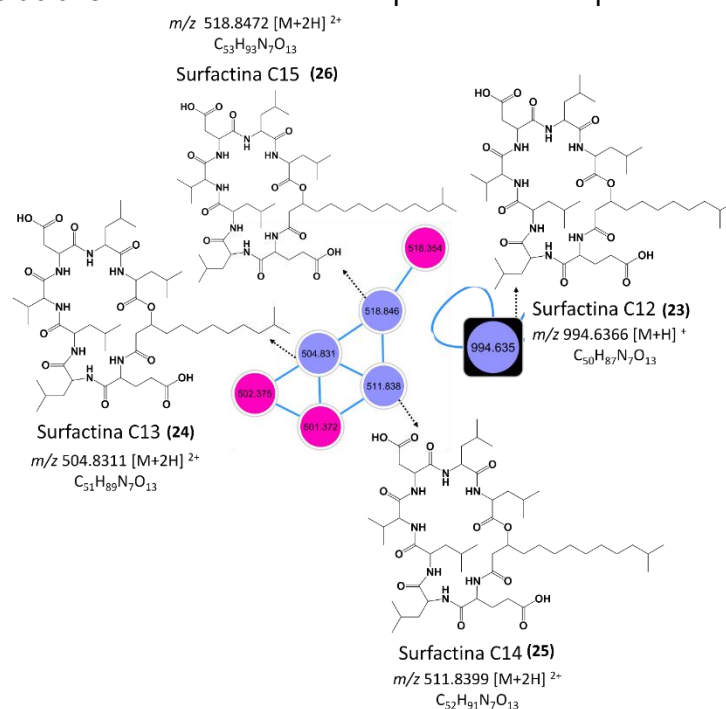


citados acima, foram agrupados em famílias para a espécie de *B. amyloliquefaciens*. O ácido macrolítico, m/z 421,2585 (36), foi identificado neste estudo em uma FM única para *B. subtilis*, composta por outros quatro íons agrupados nesta mesma família (m/z 498,302, m/z 538,334, m/z 540,349, m/z 544,292), indicando similaridade com essa substância de acordo com o perfil espectral (Figura 3).

Devido sua natureza antimicrobiana diversos estudos têm apontado a ação sobre fitopatógenos das macrolactinas, além de sua capacidade de induzir a resistência sistêmica em plantas (ISR). Segundo Yuan et al. (2016), macrolactina A, 7- O -malonil macrolactina A e 7- O -succinil macrolactina A produzidas por *B. amyloliquefaciens* são capazes de alterar a comunidade bacteriana do solo, reduzindo a diversidade α da comunidade bacteriana com diminuição significativa na abundância relativa de Acidobacterias.

A identificação do lipopeptídeo surfactina C₁₂ de m/z 994,6435 (23) foi anotado para a espécie *B. amyloliquefaciens* na forma de um *single* nodo (Figura 4). Ao examinar a RM CR outras isoformas de surfactinas foram putativamente identificadas formando uma FM única para *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, composta por outros seis nodos agrupados nesta mesma família. Os compostos com m/z 504,8337 (24), m/z 511,8415 (25) e m/z 518,8493 (26) corresponderam aos íons precursores das surfactinas C₁₃, C₁₄ e C₁₅ na forma de adutos $[M+2H]^{2+}$ (Figura 4, Tabela 1). A análise da família molecular mostrou compostos com diferenças de massa de 14 Da, 28 Da e 42 Da, sugerindo moléculas com diferentes comprimentos de cadeias acila dentro da mesma família de isoformas, auxiliando na anotação destes compostos. Além disso, observou-se outros nodos não anotados desta família como potenciais derivados de lipopeptídeos.

Figura 4: Grupo de surfactinas obtidas pela desreplicação do GNPS para espécies de *Bacillus* spp. isoladas de *C. peruvianus* regenerado. Identificadas putativamente por similaridades espectrais, perfil de fragmentação e literatura. Nodos na cor roxa representam a espécie *B. amyloliquefaciens*. Nodos na cor rosa representam a espécie *B. licheniformis*.



Fonte: Autor.

A produção de biofilmes bacterianos está relacionada a produção de surfactinas que atuam principalmente sobre a mobilidade do biofilme e o estabelecimento dos biofilmes está correlacionado diretamente com a capacidade de colonização microbiana das raízes de



plantas (Zerouh et al., 2014). As propriedades anfílicas das surfactinas contribuem para a difusão de metabólitos produzidos a partir do estabelecimento dos biofilmes bacterianos, estimulando o desenvolvimento da planta por meio da solubilização de minerais insolúveis como fosfatos e oligoelementos, promovendo uma absorção aprimorada de nutrientes (Singh et al., 2018).

É relevante ressaltar que os isolados endofíticos analisados em nível de metaboloma neste estudo, representam apenas uma fração da microbiota associada a *C. peruvianus*. Os metabolomas identificados foram obtidos sob condições de bioprospecção *in vitro*, no entanto, no ambiente natural, os estímulos moleculares provenientes das interações com as plantas hospedeiras e outros microrganismos podem influenciar qualitativa e quantitativamente o perfil metabólico. Ainda assim, os resultados deste estudo demonstram que, mesmo em condições axênicas, as bactérias endofíticas de *C. peruvianus* apresentam uma elevada complexidade molecular em seus metabólitos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise metabolômica baseada na geração de redes moleculares apoiada por técnicas analíticas de alta sensibilidade e seletividade de aquisição de dados químicos, como a espectrometria de massas, permite visualizar e explorar o potencial químico contido em um metaboloma de maneira muito mais abrangente. O uso das redes moleculares torna possível a identificação de biomoléculas muitas vezes negligenciadas por métodos direcionados na identificação de metabólitos especializados e neste estudo, forneceu informações químicas diferenciais sobre o metaboloma de bactérias endofíticas isoladas de *C. peruvianus* cultivado a partir de sementes e de somaclone regenerado *in vitro*.

Observou-se que o perfil químico do metaboloma endofítico isolado da planta regenerada apresenta maior diversidade de substâncias anotadas em comparação com o metaboloma endofítico isolado da planta selvagem. Diversos metabólitos especializados relacionados à interação entre planta hospedeira e endófitos foram identificados de forma putativa, sendo que várias classes de compostos foram exclusivas ao metaboloma endofítico de acordo com a planta hospedeira.

Entre as classes químicas de compostos anotadas, destacam-se terpenoides, lipoaminoácidos e glicerofosfolipídeos para a rede molecular da planta cultivada a partir de sementes, enquanto flavonoides, macrolídeos, fenóis e álcoois graxos foram putativamente identificados para a rede molecular da planta regenerada. Assim, a utilização de redes moleculares proporcionou uma compreensão mais detalhada dos metabolomas endofíticos presentes em plantas de *C. peruvianus* com diferentes origens genéticas, abrindo caminho para estudos futuros direcionados à elucidação e caracterização de estruturas químicas e classes metabólicas de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS

ABISADO, Rhea G. et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. **MBio**, v. 9, n. 3, p. 10-28, 2018.

AGHDAM, Shiva Abdollahi; BROWN, Amanda May Vivian. Deep learning approaches for natural product discovery from plant endophytic microbiomes. **Environmental microbiome**, v. 16, n. 1, p. 6, 2021.

BERALDO-BORRAZZO, Jesieli et al. Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) plants obtained from seeds and from *in vitro*-regenerated



somaclone. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 335-343, 2021.

BIND, Sudha et al. Epigenetic modification: A key tool for secondary metabolite production in microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 784109, 2022.

CHEN, Lin et al. Contribution of macrolactin in *Bacillus velezensis* CLA178 to the antagonistic activities against *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1743-1752, 2021.

CHEVRETTE, Marc G. et al. Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. **Natural product reports**, v. 37, n. 4, p. 566-599, 2020.

FIDAN, Ozkan et al. Discovery and engineering of an endophytic *Pseudomonas* strain from *Taxus chinensis* for efficient production of zeaxanthin diglucoside. **Journal of Biological Engineering**, v. 13, n. 1, p. 66, 2019.

LI, Xingyu et al. Combined mass spectrometry-guided genome mining and virtual screening for acaricidal activity in secondary metabolites of *Bacillus velezensis* W1. **RSC advances**, v. 11, n. 41, p. 25441-25449, 2021.

MANGOLIN, Claudete Aparecida et al. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical genetics**, v. 35, n. 5, p. 189-204, 1997.

MANGOLIN, Claudete Aparecida et al. RAPD markers to evaluate callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae) maintained in different growth regulator combinations. **Biochemical Genetics**, v. 40, n. 9, p. 351-358, 2002.

NUNES, Adrieli Rodrigues et al. *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae) as a source of natural antioxidants: Phenolic compounds and antioxidant activity of cladode extracts in two collection periods. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 984-991, 2022.

POLLI, Andressa Domingos et al. Secondary metabolites of *Curvularia* sp. G6-32, an endophyte of *Sapindus saponaria*, with antioxidant and anticholinesterasic properties. **Natural product research**, v. 35, n. 21, p. 4148-4153, 2021.

QIN, Guo-Fei et al. MS/MS-based molecular networking: an efficient approach for natural products dereplication. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 157, 2022.

RAIMI, Adekunle; ADELEKE, Rasheed. Bioprospecting of endophytic microorganisms for bioactive compounds of therapeutic importance. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 5, p. 1917-1942, 2021.

SANTOS, Éverton et al. *Cereus hildmannianus* (K.) Schum.(Cactaceae): Ethnomedical uses, phytochemistry and biological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. e113339, 2021.

SCHYMANSKI, Emma L. et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 2097–2098, 2014.

SHANNON, Paul et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of



biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SINGH, Ratan et al. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. **Pedosphere**, v. 28, n. 2, p. 170-189, 2018.

SUBRAMANIAN, Mugesh; MARUDHAMUTHU, Murugan. Hitherto unknown terpene synthase organization in taxol-producing endophytic bacteria isolated from marine macroalgae. **Current Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 918-923, 2020.

WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WANG, Lanxiang et al. Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. e233, 2022.

XU, Yao et al. Macrolactin XY, a macrolactin antibiotic from marine-derived *Bacillus subtilis* sp. 18. **Marine Drugs**, v. 22, n. 8, p. 331, 2024.

YAN, Huayu et al. Production of rare ginsenosides Rg3 and Rh2 by endophytic bacteria from *Panax ginseng*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 31, p. 8493-8499, 2019.

YU, Xiao-Quan et al. Flavonoids repress the production of antifungal 2, 4-DAPG but potentially facilitate root colonization of the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens*. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 5073-5089, 2020.

YUAN, Jun et al. Antibacterial compounds-macrolactin alters the soil bacterial community and abundance of the gene encoding PKS. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. e1904, 2016.

ZENG, Xiangyong et al. Quorum sensing-mediated microbial interactions: Mechanisms, applications, challenges and perspectives. **Microbiological Research**, v. 273, p. e127414, 2023.

ZERIOUH, Houda et al. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2196-2211, 2014.